病毒核酸提取前的高温灭活过程显著降低可检出病毒核酸模板量

张沁欣、赵庆顺*

南京大学 模式动物研究所

*通讯作者，南京大学模式动物研究所，南京，210061，qingshun@nju.edu.cn

chinaXiv:202002.00034v1

［摘要］新冠病毒是病毒感染性肺炎（COVID-19）的病原体。然而，新冠病毒核酸临床检出的假阴性率很高。假阴性意味着漏检，不仅会导致疑似患者不能快速确诊，而且会使漏检者成为潜在的病毒传染源。因此，提高新冠病毒核酸检出率十分迫切。目前国家卫健委相关指南要求在提取样本核酸前需将样本置于56℃以上以灭活病毒。这一灭活过程无疑是保护临检人员免受病毒暴露所必需，但也会破坏病毒核酸的完整性，导致部分样品不能被正常检出，成为高假阴性率的原因之一。最近，我们以猪 PDEV 冠状病毒（疫苗）作为模型研究了高温灭活过程对病毒核酸完整性的影响。结果表明：保存在常用等渗盐溶液 Hank's 液中的样品经 56°C 孵育 30 分钟后可检出冠状病毒核酸损坏了一半，而以 92°C 孵育 5 分钟，则可检出的冠状病毒核酸损失了 96%以上。当采用一款市售的 R503 样品保存液保存 PEDV 时，经 56°C 孵育 30 分钟后病毒核酸可检出量是 Hank's 液的 3 倍，若是 92°C 孵育 5 分钟，则可检出量是 Hank's 液的 42 倍。这些结果提示，使用可有效保护样本 RNA 特别是避免样本 RNA 在高温灭活时受损的样品保存液，不但可以让临检人员依然能够在高温灭活后使用样品，还有望提高阳性检出率。

关键词：冠状病毒；2019-nCoV； 病毒高温灭活；核酸降解；假阴性；荧光定量 RT-PCR

1. 前言

新冠病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2，或 SARS-CoV-2)据信是目前病毒感染性肺炎（Corona Virus Disease 2019，或 COVID-19）的病原体[1]。是否携带新冠病毒成为判断是否感染的关键临床指标之一，两次新冠病毒核酸检测均为阴性也是 COVID-19 肺炎治愈的临床标准之一。然而，众多来源的消息显示，临床检测中新冠病毒核酸检出的假阴性率很高,阳性率只有 30~50%[2]。假阴性意味着漏检，不仅会导致临床中对疑似患者不能迅速确诊，也会导致漏检的病毒携带者成为潜在的病毒传染源。因此，提高新冠病毒核酸检出率十分迫切。

目前的新冠病毒核酸检测主要采用的是荧光定量 RT-PCR 技术。PCR 是一项非常灵敏的技术。理论上，哪怕模板只有 1 个拷贝（1 个病毒），就有可能被检测出来，在模板量大于 100 个拷贝/10 微升的情况下，PCR 扩增结果会非常稳定。

新冠病毒是一个单股正链 RNA 病毒。用作检测的病毒基因模板是从病人样品中通过核酸提取的办法获得的。北京协和医院依据国家卫健委颁发的《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南（第三版）》制作的核酸检测过程教学视频（网络版，视频 3 分 08 秒至 3 分 40 秒）显示：在准备模板前，需将采集到的样品在 56℃条件下进行 30 分钟灭活。国家卫健委颁发的《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南（第四版）》也涉及灭活材料的操作：“感染性材料或活病毒在采用可靠的方法灭活后进行的核酸检测、抗原检测、血清学检测、生化分析等操作应当在生物安全二级实验室进行”[3]。中华医学会检验医学分会发布的《新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识》明确指出需将样品 56°C 孵育至少 45 分钟或更高温度进行灭活[4]。这个过程的目的是灭活病毒。新型冠状病毒传染性极强，因此，为了保护临检人员的安全，将采集到的样品在 56°C 条件下进行灭活成为许多一线临床检测单位要求的必不可少的步骤。

在本研究中，我们以猪流行性腹泻病毒 PEDV（一种冠状病毒，疫苗）为模型，研究了高温灭活过程对保存在 Hank’s 溶液中冠状病毒完整性的影响。结果表明，与不经灭活的对照相比，56°C 孵育 30 分钟的灭活过程会导致可检出的冠状病毒模板损失一半，而 92°C 孵育 5 分种可检出的冠状病毒模板不到对照的

chinaXiv:202002.00034v1

3.2%。有意思的是，当采用 R503 保存样品时，高温灭活则不影响可检出的病毒模板量。

总之，我们的研究结果表明高温灭活会促进样品内的病毒核酸的降解，从而会导致样品中的新冠病毒核酸的数量不足，最终导致部分样品检测出现假阴性。而采用优化的保存液，则可以实现在灭活病毒以确保临检人员安全的情况下，提高样品中病毒核酸的检出正确率，避免或减少假阴性的产生。

2. 结果

2.1 斑马鱼胚胎细胞经 56°C 处理后总 RNA 明显降解

多份新冠病毒核酸检测指南中均提到在提取核酸前需要进行 56°C 以上灭活病毒以降低感染风险。但是，新冠病毒是单链 RNA 病毒，而 RNA 本身易受核糖核酸降解，且核糖核酸酶的最佳活性温度是 60°C，因此这个高温灭活过程理论上会导致样品中的 RNA 的完整性受损，从而不当地降低了病毒模板量，最终导致部分样品不能被正常检出。为验证这种假设，我们首先测试了 56°C 处理对斑马鱼 72 hpf 胚胎细胞内的 RNA 的稳定性的影响。

实验共分为 3 个组，每组设 3 个重复：第 1 组为在胚胎中加入 Trizol（核糖核酸酶抑制剂）后置于 56°C 水浴锅中孵育 30 分钟；第 2 组为在胚胎中加入 Trizol 后置于 4°C 冰箱中静置 30 分钟；第 3 组为在胚胎中加入 1 × PBS 后置于 56°C 水浴锅孵育水浴 30 分钟。接下来，按常规方法提取胚胎细胞内的总 RNA。以 1% 琼脂糖凝胶电泳观测提取的核酸的质量，结果显示（图 1）：在没有核糖核酸酶抑制剂（Trizol）的保护下，56℃灭活这一步骤导致了 RNA 的明显降解，出现了明显的拖尾现象，其中代表性的小分子量 RNA 条带减少的更为明显。将斑马鱼胚胎样品保存在 Trizol 中，然后进行 56℃灭活，再实施总 RNA 的提取，结果更加糟糕，代表性的 28S RNA 条带明显变弱，提示了更多的（长链）RNA 被降解。

2.2 Hank’s 液中的人细胞经 56°C 以上处理后总 RNA 和基因组 DNA 均明显降解

进一步地，我们测试了 56°C 以上处理对人细胞系细胞内的 RNA 的稳定性的影响。以 Hank’s 作为细胞保存液悬浮细胞（293T 细胞）制备 6 组实验样品。每组样品中还包括猪 PEDV 冠状病毒（RNA 病毒）和噬菌体λ DNA（DNA 病毒）。

chinaXiv:202002.00034v1

其中 4 组置于 56°C 分别进行 30、45 和 60 分钟的孵育，第 5 组置于 92°C 中孵育 5 分钟，第 6 组置于 4°C 中作为对照。

待全部孵育完成后，按常规方法分别提取核酸（包括 DNA 和 RNA），然后进行 1.2%的凝胶电泳。结果发现（图 2）：与保存在 4°C 对照组样品相比，经过 56°C 30-60 分钟孵育的样品中的核酸无论是 DNA 还是 RNA 都呈现明显的降解，其中 28S 和 18S RNA 条带均变得模糊至不可见，而 92℃孵育 5 分钟后，则几乎看不到任何电泳条带。

2.3 Hank’s 液中的猪 PEDV 冠状病毒经 56°C 以上处理后可检出模板数明显降低

为研究 56°C 以上处理是否也造成了病毒核酸的损坏，我们以荧光定量 RT-PCR 方法检测了猪 PEDV 冠状病毒在处理后的含量。结果（图 3-6）显示：与 4□对照组的 Ct（threshold cycle value）（31.94 ± 0.10）相比，56°C 孵育 30 分钟组的 Ct（32.94 ± 0.18）平均值增大了 0.996（$p<0.01$），意味着 56°C 孵育 30 分钟处理导致样品中可检出的病毒模板数只剩下未经灭活处理的 50.11%（1/2^0.9967）。而经 92°C 灭活处理 5 分钟的实验组的 Ct（36.84 ± 0.37）平均值则增加了 4.8947（$p<0.0001$），意味着 92°C 灭活处理 5 分钟导致样品中可检出的病毒模板数只剩下未经灭活处理的 3.36%（1/2^4.8947）。

进一步地，我们以荧光定量 PCR 法对样品中的病毒 DNA（λ噬菌体）进行检测，结果（图 7-8）发现：与 4°C 保存组的 Ct（23.02 ± 0.15）相比，56°C 孵育 30 分钟的 Ct（23.55 ± 0.20）平均值增加了 0.5230（$p<0.01$），意味着 Hank’s 液保存的样本经 56°C 孵育 30 分钟后可检出的病毒模板数只有未经高温处理的 69.59%（1/2^0.5230）。而经 92°C 灭活孵育 5 分钟的实验组的 Ct（25.58 ± 0.21）平均值增加了 2.5572（$p<0.0001$），意味着 Hank’s 液保存的样本经 92°C 孵育 5 分钟后可检出的病毒模板数只有未经高温处理的 16.99%（1/2^2.5572）。

以上结果证明，高温处理均明显下降了 RNA 病毒和 DNA 病毒的可检出量。

2.4 含 SDS 的样本保存液可部分地保护人 293T 细胞内的 RNA 免受高温处理导致的降解

为提高经高温处理后样品中的病毒核酸可检出量，研制出新的样本保存液十

chinaXiv:202002.00034v1

分必要。为此，我们首先配制了 3 种保存液（保存液 1、保存液 2 和保存液 3），检查一下是否存在可保护病毒样本免受高温处理危害的样本保存液。

实验共分成 3 组，在用作测试的人细胞系细胞（293T）中分别加入保存液 1、保存液 2 和保存液 3。每组再设 56°C 处理组（置于 56°C 水浴锅中水浴 30 分钟）和 4°C 保存组（置于 4°C 冰箱中保存 30 分钟）。待所有处理完成后，按常规方法提取样品中的总 RNA，然后进行 1.0%的琼脂糖凝胶电泳。结果显示（图 9）：高温对保存液 1 中的样品影响最大，标志性的 28S 和 18S 条带均消失，而保存液 2（含蛋白酶 K）与保存液 3 中的 RNA 质量较好，其中保存液 2 中的样品 28S 和 18S 条带均明显可见，几乎没有在其它组中看到的拖尾现象。这些结果表明，SDS（保存液 1 中没有而保存液 2 和 3 中均有）可能具有保护 RNA 免受 RNAase 降解的作用，而蛋白酶 K 与 SDS 联用的保护效果可能更好（保存液 2 中同时含有两种物质，而保存液 3 中仅有 SDS）。有意思的是，当保存在 3 种保存液中的样品置于 4°C 中保存半小时后，样品 RNA 仍有明显降解，可能原因是 SDS 在低温下溶解性下降。

2.5 R503 可明显地提高对人 293T 细胞内的 RNA 和基因组 DNA 的保护作用

为进一步优选可以保护 RNA 免受高温处理带来的危害，我们以 R503（南京诺唯赞生物科技有限公司）作为细胞保存液进行试验。同 Hank's 液的试验相同，以 R503 制备 6 组实验样品（每组样品中还包括猪 PEDV 冠状病毒和噬菌体λ DNA），其中 4 组置于 56°C 分别进行 30、45 和 60 分钟的孵育，第 5 组置于 92°C 中孵育 5 分钟，第 6 组置于 4°C 中作为对照。待全部孵育完成后，按常规方法分别提取核酸，然后进行 1.2%的琼脂糖凝胶电泳。结果显示（图 10）：与保存在 4°C 的对照组样品相比，经 56°C 孵育 30-60 分钟的样品中的核酸无论是 DNA 还是 RNA 也都呈现明显的降解，其中标识人细胞总 RNA 的 28S 和 18S 条带附近均有明显的拖尾现象，标识基因组 DNA 的大片段条带亮度变弱。而 92°C 孵育 5 分钟后，则几乎看不到基因组 DNA 条带和 28S 条带。不过，与 Hank's 液相比，核酸降解的情况要好些，提示 R503 对核酸（无论是 RNA 还是基因组 DNA）的保护作用非常明显。

chinaXiv:202002.00034v1

2.6 R503 保存液中的猪 PEDV 冠状病毒经 56°C 以上温度处理后病毒可检出模板量无明显改变

为研究 56°C 以上处理是否也造成了 R503 保存的病毒核酸的损坏，我们以荧光定量 RT-PCR 方法检测了猪 PEDV 冠状病毒在高温处理后的含量。结果（图 11-14）显示：与 4°C 对照组的 Ct（31.64 ± 0.10）相比，56°C 孵育 30 分钟组的 Ct（31.31 ± 0.17）平均值没有明显改变（两种之间的变化小于 0.5）。而经 92°C 灭活处理 5 分钟的实验组的 Ct（31.43 ± 0.08）平均值也没有明显改变（两种之间的变化小于 0.5）。这些结果表明 56°C 以上处理并未显著影响保存在 R503 中的病毒可检出量，提示病毒核酸虽然有降解，但残留的小片段 RNA 仍可用作荧光定量 RT-PCR 的模板，且在模板量上无显著变化。

进一步地，我们以荧光定量 PCR 的方法检测了λ噬菌体 DNA 在高温处理后的含量。结果（图 15-16）显示：与 4°C 对照组的 Ct（21.61 ± 0.06）相比，56°C 孵育 30 分钟组的 Ct（21.71 ± 0.04）平均值没有明显改变（两种之间的变化小于 0.5）。而经 92°C 灭活处理 5 分钟的实验组的 Ct（22.90 ± 0.26）平均值增加了 1.2880，意味着 R503 液保存的样本经 92°C 孵育 5 分钟后可检出的病毒模板数只有未经高温处理的 40.95%（1/2^1.2880），提示即使保存在 R503 中，92°C 处理也明显下降了 DNA 病毒的可检出量。

chinaXiv:202002.00034v1

2.7 R503 保存样品经 56°C 处理后可检出的 RNA 冠状病毒模板量显著高于 Hank’s 液保存的样品

为比较 R503 与普通的等渗液在保护微量 RNA 冠状病毒可检出量方面的优劣，我们首先比较了二者在 4℃保存条件下保存的微量 RNA 冠状病毒可检出量之间是否有差异。结果表明（图 17）：两种保存液下病毒的检出率相似，对应的 Ct 平均值之差小于 0.5（3.64 ± 0.10 vs 31.95 ± 0.10），提示两种保存液在 4°C 条件下保存的样品中的病毒可检出模板量无显著差异。

然而，经 56℃孵育 30 分钟后，两种保存液下病毒检出的 Ct 分别为 31.31 ± 0.17（R503）和 32.94 ± 0.18（Hank’s）。Hank’s 保存样品的病毒 Ct 平均值比 R503 的增加了 1.6305（$p<0.0001$；图 18）；即 Hank’s 液保存的样品经过 56℃灭活处理 30 分钟后可检出的病毒模板数只有 R503 保存液的 32.30%（1/2^1.6305）。

进一步地，经 92℃灭活处理 5 分钟后，两种保存液下病毒检出的 Ct 分别为 31.43 ± 0.08 (R503）和 36.84 ± 0.37（Hank’s），Hank’s 液保存样品的病毒 Ct 平均值比 R503 的增加了 5.4125（$p<0.0001$；图 19）；即 Hank’s 液保存的样品经过 92℃灭活处理 30 分钟后可检出的病毒模板数只有 R503 保存液的 2.35%（1/2^5.4125）。

3. 讨论

RNA 的完整性易受核糖核酸酶破坏，因而在基础分子生物学技术训练中，对正确操作 RNA 样品有严格的要求。被训练者始终被要求要在无核糖核酸酶污染的条件下进行 RNA 操作。这些条件包括实验操作时操作人员要佩戴口罩、操作时不能对着样品说话；操作时戴手套，不能用手直接接触样品；使用无核糖核酸酶污染的枪头（必要时需要使用带滤芯的枪头，以防止来自移液枪中的污染），使用无核糖核酸酶污染的试剂；操作台面要清洁，必要时需要用去除核糖核酸酶的试剂进行清洁。而样品在被核糖核酸酶抑制剂保护前则被要求始终置于盛有冰的冰盒中或 4°C 冰箱中。总之，在整个操作过程中，要防止样品中的 RNA 被核糖核酸酶所降解。

在临床检测中，特别是在检测烈性传染的病毒核酸时，由于硬件条件不完善，临检人员始终受到烈性传染病毒暴露的威胁，因而在“开盖”样品前，普遍进行高温灭活病毒以保护临床检验人员的安全已成为从事临检工作的专家共识。然而，理论上，这种高温灭活处理将损坏样品 RNA，包括其中可能的病毒 RNA 的完整性，降低病毒可检出的模板量。

在本研究中，我们通过对斑马鱼胚胎细胞和人细胞系细胞进行 56°C 以上高温处理，发现细胞的总 RNA 降解明显，而以猪瘟病毒作为冠状病毒模型所做的高温灭活处理的研究发现，保存在普通等渗溶液中的样品经 56°C 孵育 30 分钟即可以让样品中可检出的冠状病毒模板减少了一半。若以 92°C 孵育 5 分钟，则可检出的冠状病毒模板损失了 96%以上。

新冠病毒正在以其极强的传染性威胁全国及全世界人民的健康安全。然而，以荧光定量 RT-PCR 作为检测手段的新冠病毒检测的阳性率目前仅有 30~50%，导致奇高的假阴性率。导致假阴性率发生的原因很多，模板的质量应该是需要考虑的重要因素之一。

chinaXiv:202002.00034v1

陈培松等新近发表的研究论文指出使用56 ºC 30 min处理咽拭子标本对后续2019 新型冠状病毒核酸 qPCR 检测无明显的影响[5]。但作者在讨论中同时提到了研究的局限性在于："1）由于阳性咽拭子标本较少，只能够对仅有的两个阳性标本进行验证；2）在检测的两个阳性标本， CT 值均比较高（未稀释时，分别为 19 和 24)，对于某些 CT 值偏低的标本，是否存在同样的相关性，仍需要进一步探讨；3）研究者的实验结果完成比较早（1 月 24 号完成）， 当时普遍使用的是不带内参的单通道试剂，如若能结合内参基因，N 基因， ORF 基因一起分析会提供更详细的验证信息；4） 本研究仅比较了一个厂家的试剂，是否其他厂家的试剂也是如此，仍需更多的数据支持。"考虑到这些局限性并结合高温灭活处理导致的猪冠状病毒核酸完整性受损的实验证据，建议立即开展有关高温灭活对新冠病毒核酸完整性影响的系统性研究并开发保护新冠病毒核酸免受高温灭活损坏的样品保存液：

1）研究确认高温灭活是否确实影响了新冠病毒核酸的完整性，导致病毒核酸的可检出量显著下降。理论上，在核糖核酸酶的活性没有被抑制的情况下，高温灭活处理会导致核酸的降解，从而显著降低病毒核酸的检出率。我们以猪PDEV 冠状病毒为模型的实验支持上述理论推测。但是，我们的研究毕竟只是在猪 PDEV 冠状病毒上开展的，尚缺乏来自新冠病毒经高温灭活后可检出量是否下降的直接证据(我们没有新冠病毒材料，尚没有直接从事新冠病毒研究的资质)。因此，立即布置开展高温灭活对新冠病毒核酸可检出率影响的研究十分迫切。

2）研究开发可保护新冠病毒核酸免受高温灭活损坏的样品保存液，提高新冠病毒核酸的可检出量。高温灭活是保护一线临检人员安全的必需措施，因而是临床检测新冠病毒核酸普遍采用的方法。理论上，如果能抑制核酸核酸酶的活性，那么高温灭活过程将会减少对病毒核酸完整性的影响。在本研究中，将猪 PEDV 保存在 R503 保存液中时，样品经 56ºC 孵育 30 分钟后其病毒核酸可检出量是 Hank's 液保存样本的 3 倍；若是 92ºC 孵育 5 分钟的话，R503 保存的冠状病毒可检出量是 Hank's 液保存样本的 42 倍。这些结果提示，存在一种保存液可有效保护病毒核酸完整性，从而提高其核酸可检出率。不过，这一结论仍缺乏来自新冠病毒的直接证据。利用新冠病毒作为研究对象，首先需要回答，新保存液保存的病毒在经高温灭活后是否依然存在感染性？其次这种可抑制核糖核酸酶的保存

chinaXiv:202002.00034v1

液是否确实可提高新冠病毒经高温灭活后的核酸可检出量？

高温灭活也破坏了 DNA 的完整性，降低了 DNA 病毒可检出的模板量。在此不作详细讨论。

参考文献

[1] Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X.-S., Zhao, K., Chen, Q. J., Deng, F., Liu, L. L., Yan, B., Zhan, F. X., Wang, Y. Y., Xiao, G. F., Shi, Z. L., 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. DOI:10.1038/s41586-020-2012-7

[2] 2020 年 2 月 5 日，中国工程院副院长、呼吸与危重症医学专家王辰教授在中央电视台采访中提到："核酸检测对于阳性病人，最高有 30~50%的阳性率。"

[3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 2020-02-06. 新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南（第四版）

[4] 中华医学会检验医学分会,. 2020. 新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识. 中华医学杂志. 100(00): E003-E003. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.0003

[5] 陈培松，何宇婷，黄裕立，等. 不同方式灭活口咽拭子标本对 2019 新型冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测结果的影响 [J] . 中华检验医学杂志,2020,43(00): E004-E004. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2020.0004。

致　谢

本文源于 2020 年 2 月 8 日开始针对新冠病毒高假阴性问题召集包括南京妇幼保健院的梁栋博士、南京尧顺禹生物科技有限公司的许昊、池军和袁月，以及南京大学模式动物研究所研究生贺陆青青、张赵俊杰、李楠、姜东亚、王爽、张云凤和张沁欣等开展的讨论。其后，清华大学陈亚林高级工程师就方法论提出了宝贵的建议，江苏省科技厅李汉中、江苏省信访局宋仁志、科技日报社记者张晔等在相关资料收集以及科学假设完善上提供了重要的帮助。本文的实验数据由南

chinaXiv:202002.00034v1

京尧顺禹生物科技有限公司的许昊和池军、南京诺唯赞生物科技有限公司的江明扬博士、聂俊伟博士和黄韬硕士等按作者设计的实验方案完成。北京安杰律师事务所吴立博士和中国水产科学院珠江水产研究所的李凯彬研究员参与了论文写作的讨论，东南大学赵平教授在统计学方法上给与了指导。南京尧顺禹生物有限公司的王明开和南林对本论文的顺利完成提供了诸多支持。

chinaXiv:202002.00034v1

附一、图及图例

图 1、斑马鱼 72 hpf 胚胎细胞经 56°C 孵育后总 RNA 质量电泳鉴定结果。自左向右第 1 泳道为 DNA Marker：从下向上依次为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp、3000 bp、5000 bp；第 2~4 泳道为 56°C 加 TriZol 后 56°C 孵育 30 分钟提取的总 RNA；第 5~7 泳道为加 TriZol 后 4°C 保存提取的总 RNA；第 8~10 泳道为加 PBS 后 56°C 后孵育 30 分钟提取的总 RNA。

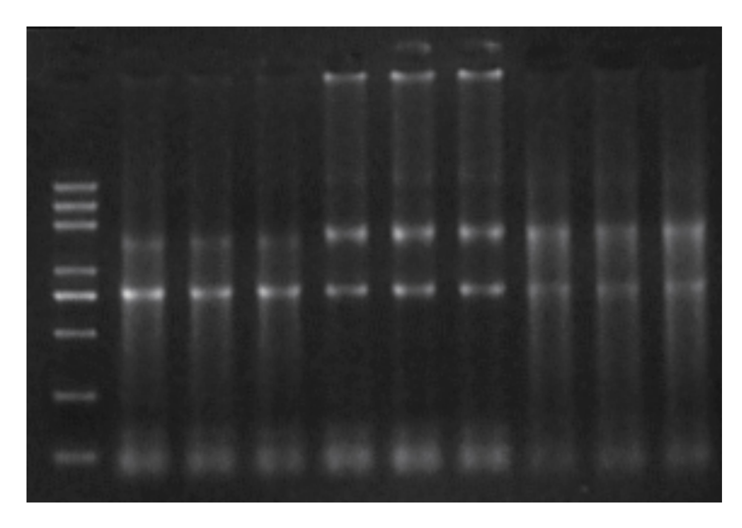
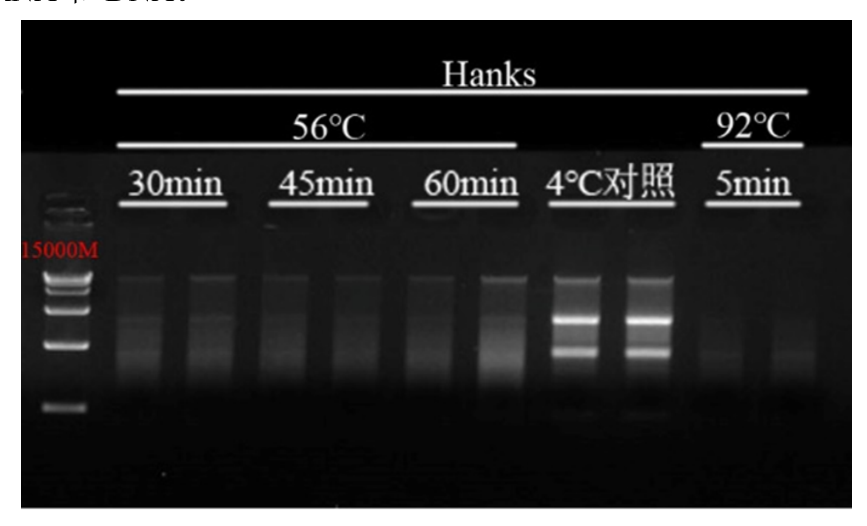


图 2、Hank’s 溶液作为保存液保存的样品经不同灭活处理后提取的核酸的琼脂糖凝胶电泳结果。自左向右第 1 泳道为 DNA Marker（Vazyme #MD103）；第 2~3 泳道为 56°C 孵育 30 分钟提取的总 RNA 和 DNA；第 4~5 泳道为 56°C 孵育 45 分钟提取的总 RNA 和 DNA；第 6~7 泳道为 56°C 孵育 60 分钟提取的总 RNA 和 DNA；第 8~9 泳道为保存在 4°C 的对照；第 10~11 泳道为 92°C 孵育 5 分钟提取的总 RNA 和 DNA。



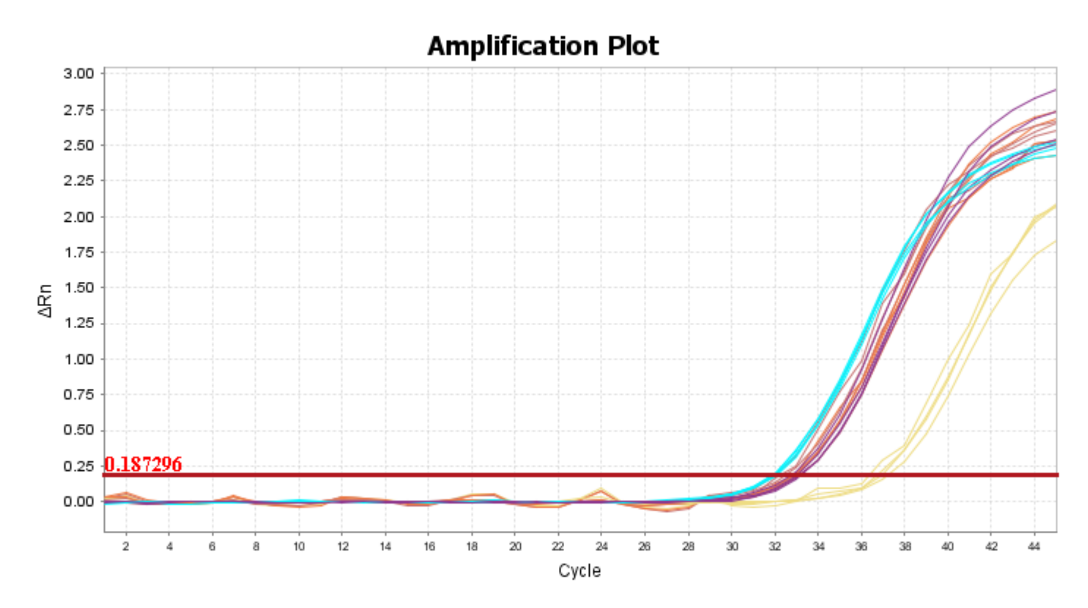
chinaXiv:202002.00034v1

chinaXiv:202002.00034v1

图 3、Hank’s 液保存的样品经 56°C 以上高温处理后提取的猪 PEDV 冠状病毒核酸的荧光定量 RT-PCR 结果（Ct 值）。H-4-0：保存在 4°C 的对照样品；H-56-30：经 56°C 孵育 30 分钟的样品；H-56-45：经 56°C 孵育 45 分钟的样品；H-56-60：经 56°C 孵育 60 分钟的样品；H-92-5：经 92°C 孵育 5 分钟的样品。每一种孵育处理设一个重复，每一个样品在定量 PCR 时设一个复孔。NTC：阴性对照。

H-4-0	31.861		NTC	Undetermined
H-4-0	31.984		NTC	Undetermined
H-4-0	31.877			
H-4-0	32.064			
H-56-30	32.889			
H-56-30	33.188			
H-56-30	32.941			
H-56-30	32.755			
H-56-45	33.221			
H-56-45	33.011			
H-56-45	32.806			
H-56-45	33.216			
H-56-60	32.554			
H-56-60	32.911			
H-56-60	32.080			
H-56-60	32.368			
H-92-5	36.920			
H-92-5	37.263			
H-92-5	36.815			
H-92-5	36.367			

图 4、Hank’s 液保存的猪 PEDV 冠状病毒样品经不同高温处理后提取的病毒 RNA 的荧光定量 RT-PCR 的典型扩增曲线图。不同颜色代表不同处理（参图 3）。



chinaXiv:202002.00034v1

图 5、Hank's 液保存的猪 PEDV 冠状病毒样品经 56°C 孵育 30 分钟后提取的病毒 RNA 的荧光定量 RT-PCR 的典型扩增曲线图与 4°C 保存对照样品之间的对比分析图。不同颜色代表的处理形式见图右侧所示。

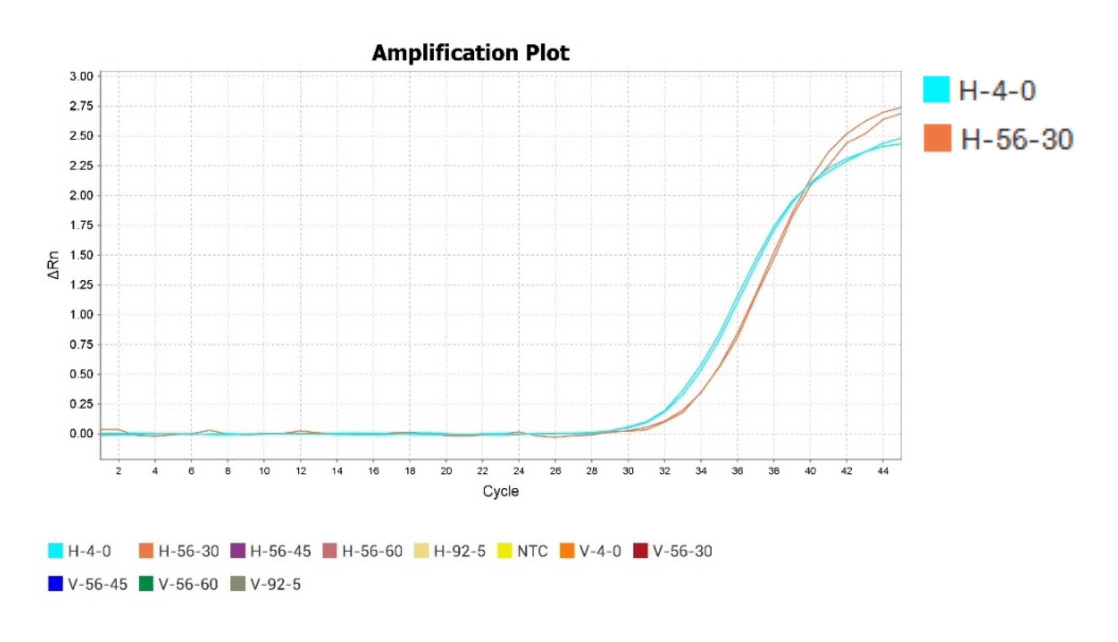


图 6、Hank's 液保存的猪 PEDV 冠状病毒样品经 92°C 孵育 5 分钟后提取的病毒 RNA 的荧光定量 RT-PCR 的典型扩增曲线图与 4°C 保存对照样品之间的对比分析图。不同颜色代表的处理形式见图右侧所示。

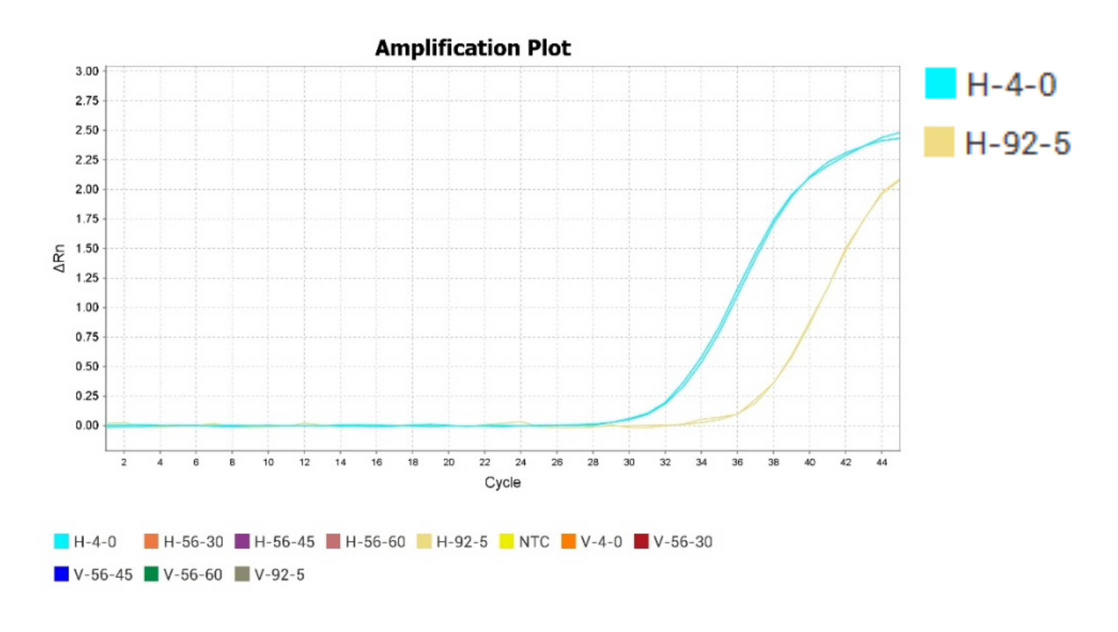
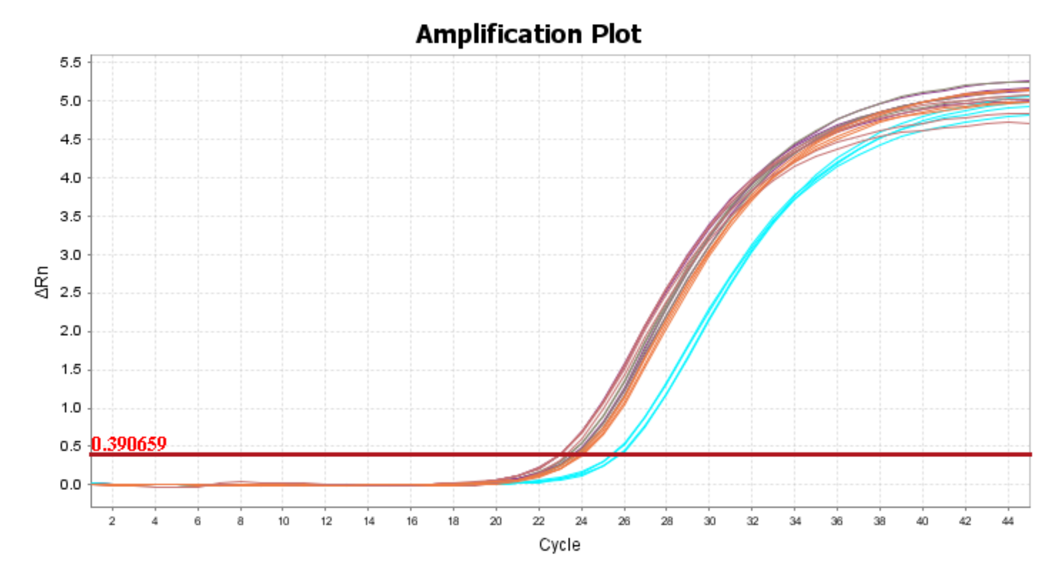


图 7、Hank's 液保存的样品经 56°C 以上高温处理后提取的λ噬菌体病毒 DNA 的荧光定量 PCR 结果（Ct 值）。H-4-0：保存在 4°C 的对照样品；H-56-30：经 56°C 孵育 30 分钟的样品；H-56-45：经 56°C 孵育 45 分钟的样品；H-56-60：经 56°C 孵育 60 分钟的样品；H-92-5：经 92°C 孵育 5 分钟的样品。每一种孵育处理设一个重复，每一个样品在定量 PCR 时设一个复孔。NTC：阴性对照。

H-4-0	22.989	NTC	31.535
H-4-0	23.244	NTC	35.487
H-4-0	22.921		
H-4-0	22.942		
H-56-30min	23.645		
H-56-30min	23.780		
H-56-30min	23.380		
H-56-30min	23.383		
H-56-45min	23.754		
H-56-45min	23.903		
H-56-45min	23.979		
H-56-45min	24.026		
H-56-60min	23.571		
H-56-60min	23.617		
H-56-60min	22.945		
H-56-60min	22.932		
H-92-5min	25.781		
H-92-5min	25.743		
H-92-5min	25.382		
H-92-5min	25.419		

图 8、Hank's 液保存的样品经不同高温处理后提取的λ噬菌体病毒 DNA 的荧光定量 PCR 的典型扩增曲线图。不同颜色代表不同处理（参图 7）。



chinaXiv:202002.00034v1

图 9、不同保存液对人细胞 293T 经 56°C 孵育 30 后总 RNA 质量电泳鉴定结果图。自左向右第 1 泳道为 DNA Marker：从下向上依次为 100 bp、250 bp、500 bp、750 bp、1000 bp、2000 bp、3000 bp、5000 bp；其中第 2~3 泳道为加 RNA 保存液 1 提取的总 RNA，点样顺序为放置 56°C 与放置 4°C；第 4~5 泳道和第 6~7 泳道为加 RNA 保存液 2 和加 RNA 保存液 3 提取的总 RNA，点样顺序都与加 RNA 保存液 1 提取的总 RNA 一致。

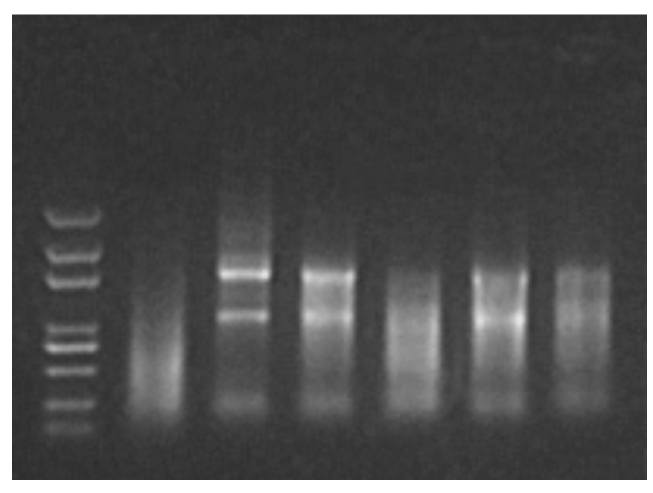
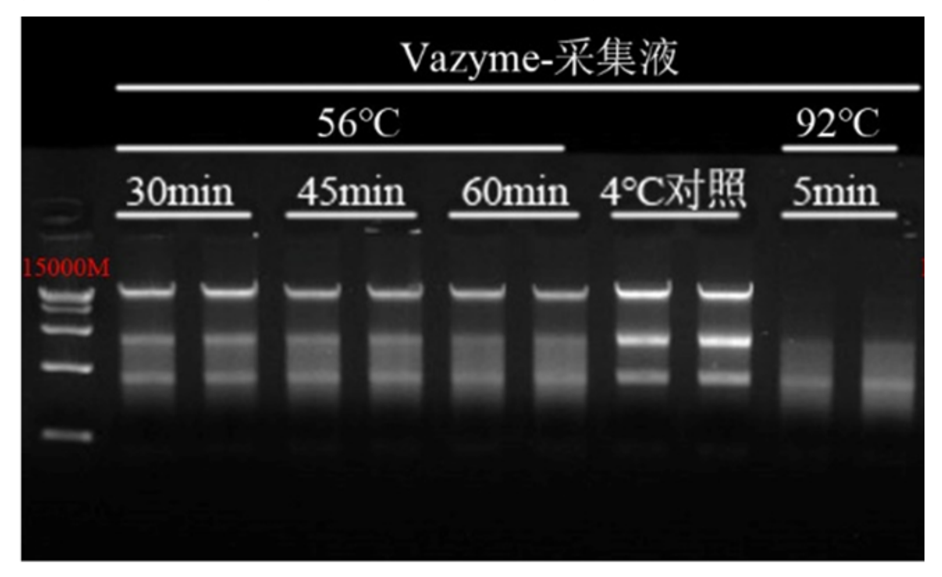


图 10、R503 保存的样品经不同高温处理后提取的核酸的琼脂糖凝胶电泳结果。自左向右第 1 泳道为 DNA Marker（Vazyme #MD103）；第 2~3 泳道为 56°C 孵育 30 分钟提取的总 RNA 和 DNA；第 4~5 泳道为 56°C 孵育 45 分钟提取的总 RNA 和 DNA；第 6~7 泳道为 56°C 孵育 60 分钟提取的总 RNA 和 DNA；第 8~9 泳道为保存在 4°C 的对照；第 10~11 泳道为 92°C 孵育 5 分钟提取的总 RNA 和 DNA。

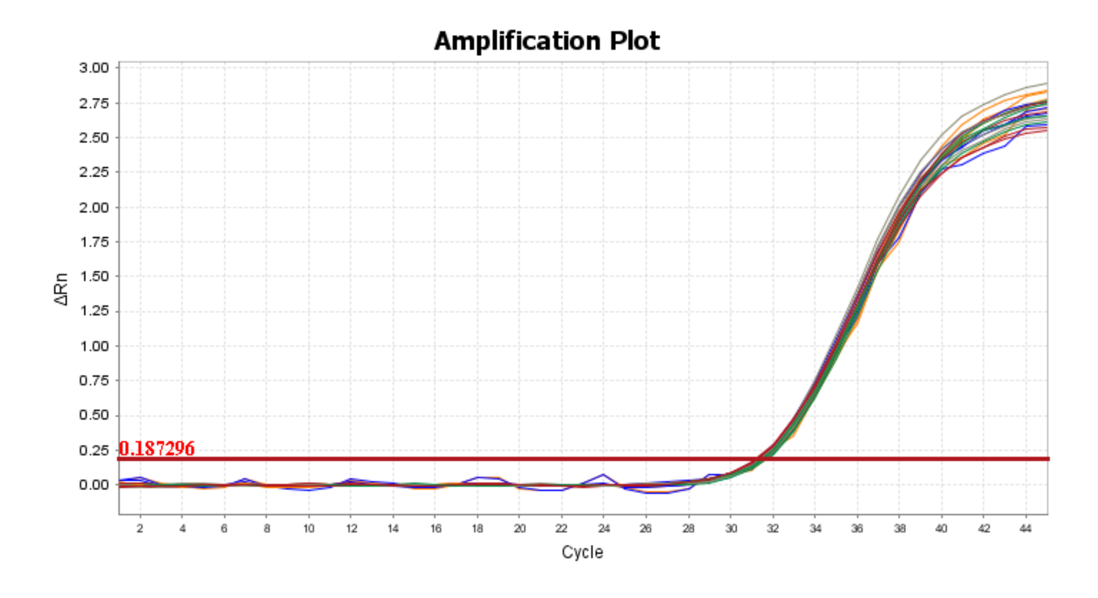


chinaXiv:202002.00034v1

图 11、R503 保存的样品经 56°C 以上高温处理后提取的猪 PEDV 冠状病毒核酸的荧光定量 RT-PCR 定量的荧光定量 RT-PCR 值结果。V-4-0：保存在 4°C 的对照样品；V-56-30：经 56°C 孵育 30 分钟的样品；V-56-45：经 56°C 孵育 45 分钟的样品；V-56-60：经 56°C 孵育 60 分钟的样品；V-92-5：经 92°C 孵育 5 分钟的样品。每一种孵育处理设一个重复，每一个样品在定量 PCR 时设一个复孔。NTC：阴性对照。

Sample Na	CT
V-4-0	31.519
V-4-0	31.630
V-4-0	31.677
V-4-0	31.755
V-56-30	31.222
V-56-30	31.225
V-56-30	31.213
V-56-30	31.561
V-56-45	31.271
V-56-45	31.356
V-56-45	31.579
V-56-45	31.480
V-56-60	31.503
V-56-60	31.659
V-56-60	31.444
V-56-60	31.717
V-92-5	31.544
V-92-5	31.380
V-92-5	31.397
V-92-5	31.394

图 12、R503 液保存的猪 PEDV 冠状病毒样品经不同高温处理后提取的病毒 RNA 的荧光定量 RT-PCR 的典型扩增曲线图。不同颜色代表不同处理（参图 11）。



chinaXiv:202002.00034v1

图 13、R503 液保存的猪 PEDV 冠状病毒样品经 56°C 孵育 30 分钟后提取的病毒 RNA 的荧光定量 RT-PCR 的典型扩增曲线图与 4°C 保存对照样品之间的对比分析图。不同颜色代表的处理形式见图右侧所示。

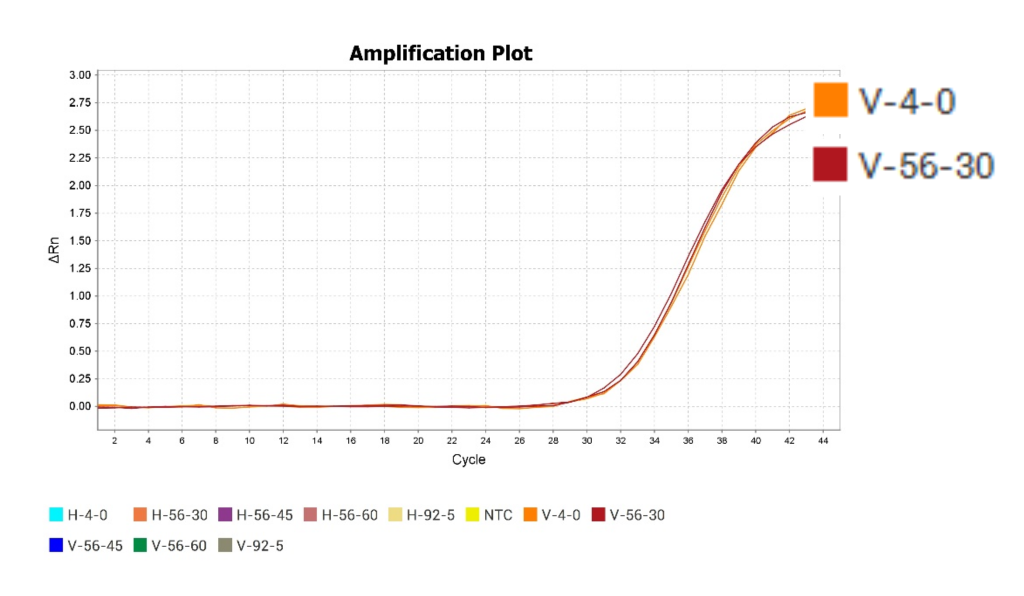
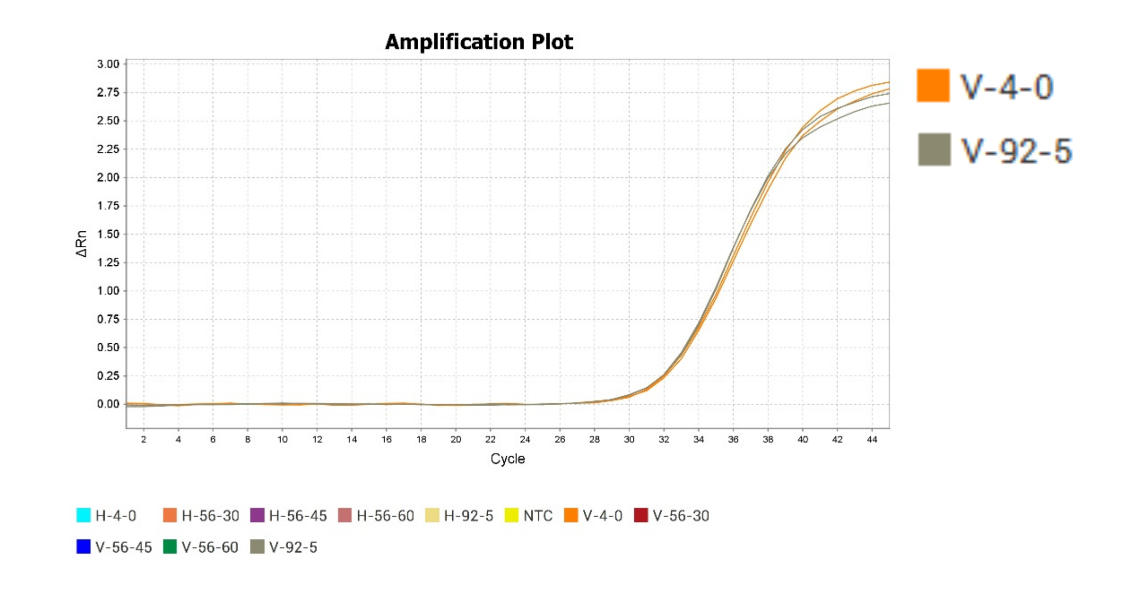


图 14、Hank's 液保存的猪 PEDV 冠状病毒样品经 92°C 孵育 5 分钟后提取的病毒 RNA 的荧光定量 RT-PCR 的典型扩增曲线图与 4°C 保存对照样品之间的对比分析图。不同颜色代表的处理形式见图右侧所示。

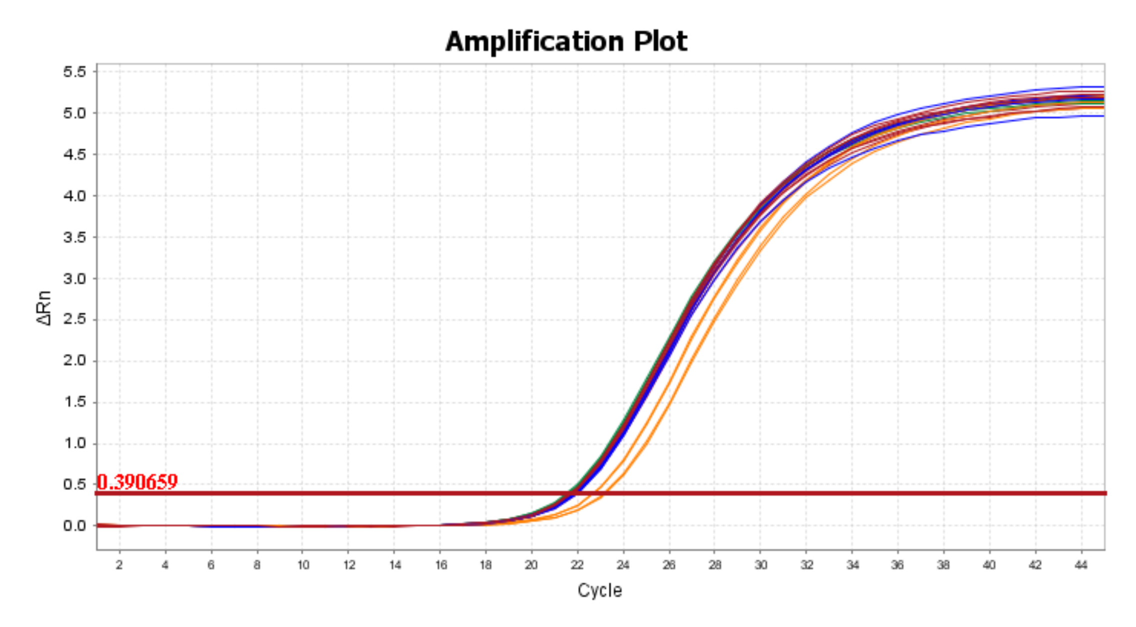


chinaXiv:202002.00034v1

图 15、R503 保存的样品经 56°C 以上高温处理后提取的λ噬菌体病毒 DNA 的荧光定量 PCR 定量结果（Ct）。V-4-0：保存在 4°C 的对照样品；V-56-30：经 56°C 孵育 30 分钟的样品；V-56-45：经 56°C 孵育 45 分钟的样品；V-56-60：经 56°C 孵育 60 分钟的样品；V-92-5：经 92°C 孵育 5 分钟的样品。每一种孵育处理设一个重复，每一个样品在荧光定量 PCR 时设一个复孔。NTC：阴性对照。

V-4-0	21.654
V-4-0	21.665
V-4-0	21.585
V-4-0	21.540
V-56-30min	21.757
V-56-30min	21.664
V-56-30min	21.730
V-56-30min	21.703
V-56-45min	21.918
V-56-45min	21.882
V-56-45min	21.798
V-56-45min	21.912
V-56-60min	21.950
V-56-60min	21.851
V-56-60min	21.953
V-56-60min	21.897
V-92-5min	23.145
V-92-5min	23.094
V-92-5min	22.671
V-92-5min	22.686

图 16、R503 保存的样品经不同高温处理后提取的λ噬菌体病毒 DNA 的荧光定量 PCR 的典型扩增曲线图。不同颜色代表不同处理（参图 15）。



chinaXiv:202002.00034v1

图17、R503液与Hank's分别保存的猪PEDV冠状病毒样品在4°C保存后提取的病毒RNA的荧光定量RT-PCR的典型扩增曲线图之间的对比分析图。不同颜色代表的处理形式见图右侧所示。

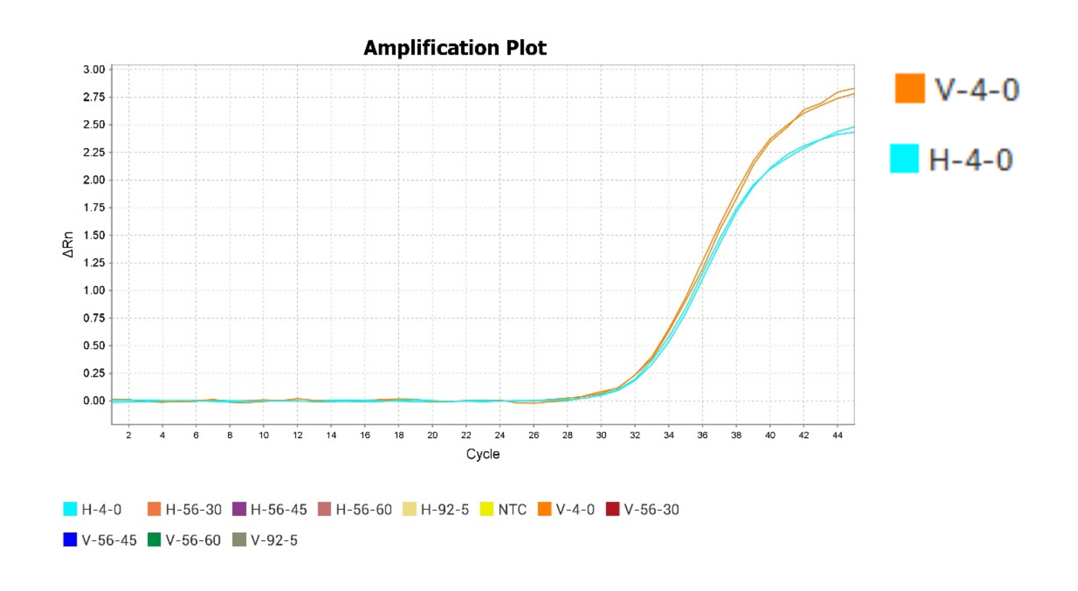
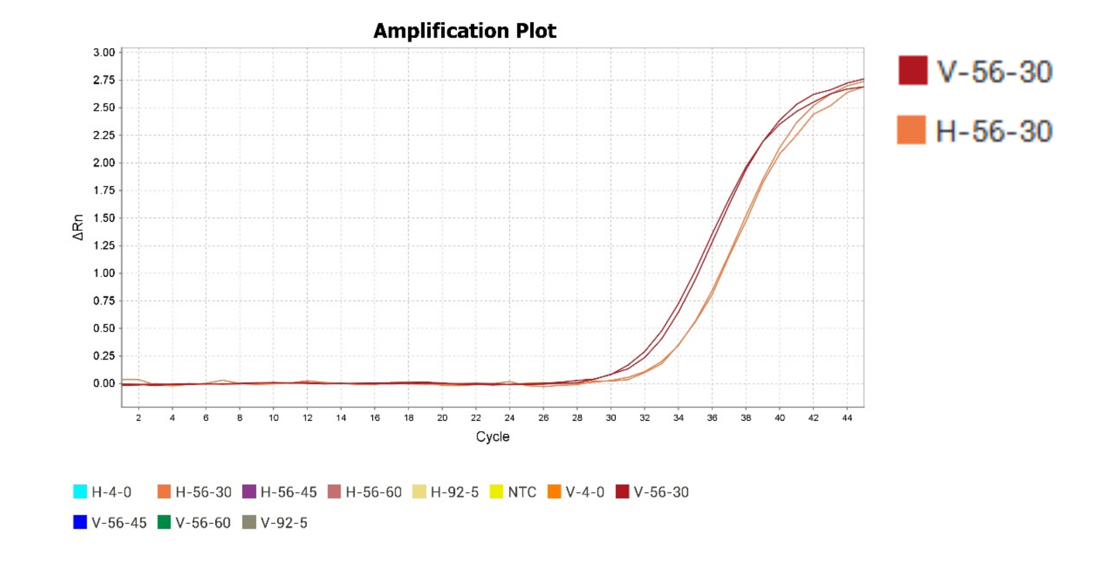
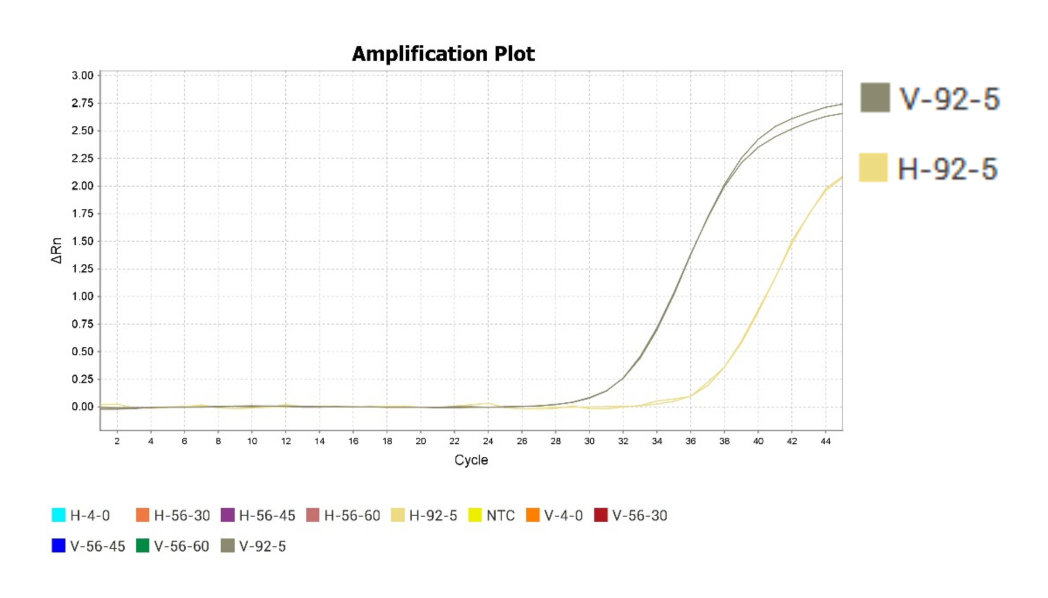


图18、R503液与Hank's分别保存的猪PEDV冠状病毒样品经56°C孵育30分钟后提取的病毒RNA的荧光定量RT-PCR的典型扩增曲线图之间的对比分析图。不同颜色代表的处理形式见图右侧所示。



chinaXiv:202002.00034v1

图19、R503液与Hank's分别保存的猪PEDV冠状病毒样品经92^{o}C孵育5分钟后提取的病毒RNA的荧光定量RT-PCR的典型扩增曲线图之间的对比分析图。不同颜色代表的处理形式见图右侧所示。



附二、材料与方法

S2.1 56°C 孵育对斑马鱼 72 hpf 胚胎细胞内总 RNA 质量的实验

斑马鱼实验方案符合南京尧顺禹生物科技有限公司的相关实验动物照看与管理的规定，获得 IACUC 的批准。实验时，收集 72 hpf 斑马鱼胚胎，用于提取总 RNA，每组 15 枚，将水分吸干后，用 TriZol 法获得总 RNA。

1) 总共分为 3 个实验组，每组为 3 个重复：第 1 组为每个重复组加入 500 µl Trizol，放到 56°C 水浴锅中，水浴 30 min 后，使用匀浆机匀浆（以不成块为最佳）；第 2 组为每个重复组加入 500 µl Trizol，放到 4°C 冰箱中，静置 30 min 后，使用匀浆机匀浆（以不成块为最佳）；第 3 组为每个重复组加入 500 µl 1 × PBS，放到 56°C 水浴锅中，水浴 30 min 后，将 PBS 溶液吸干，加入 500 µl Trizol，使用匀浆机匀浆（以不成块为最佳）。

2) 向上述裂解液中加入 100 µl 体积氯仿。盖紧离心管盖，剧烈震荡 15 sec，室温静置 3 min。

3) 4°C，12,000 g 离心 15 min。

4) 小心吸取上层水相至新离心管中，加入 250 µl 体积异丙醇。颠倒混匀后室温放置 10 min。

chinaXiv:202002.00034v1

5) 4°C，12,000 g 离心 10 min。

6) 小心弃去上清，加入 500 μl 75%乙醇（DEPC 水配制）。涡旋充分洗涤，并轻弹管底，让沉淀悬浮起来。

7) 4°C，7,500g 离心 5 min，弃上清，注意不要丢失 RNA 沉淀。

8) 重复步骤 6~7。

9) 在通风橱干燥 10 min。加入 15 μl DEPC 水溶解 RNA，待完全溶解后，取少量检测。

10）取 1 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。

S2.2 不同保存液对样品经 56°C 孵育 30 分钟后总 RNA 质量影响的实验

收集人细胞溶液每管 1,800 μl，1,500 g 离心 10 min 后，弃掉上清液，保留沉淀，一共收集 6 管，用 TriZol 法获得总 RNA。

1）6 管细胞平分为 3 个实验组：第 1 组为加入 500 μl RNA 保存液 1（100 mM Tris (pH7.5)，12.5 mM EDTA，150 mM NaCl，250 μg/ml 蛋白酶 K），一管放到 56°C 水浴锅中，水浴 30 min，另一管放到 4°C 冰箱中，静置 30 min；第 2 组为加入 500 μl RNA 保存液 2（0.5 % SDS，0.1 M NaCl，0.01 M Tris-HCl（pH8.0），0.05M EDTA，100 μg/ml 蛋白酶 K），一管放到 56°C 水浴锅中，水浴 30 min，另一管放到 4°C 冰箱中，静置 30 min；第 3 组为加入 500 μl RNA 保存液 3（100 mM EDTA（pH8.0），100 mM NaCl，50 mM Tris-HCl（pH8.0），0.5% SDS），一管放到 56°C 水浴锅中，水浴 30 min，另一管放到 4°C 冰箱中，静置 30 min；30 min 后，所有样品 4°C，12,000 g 离心 5 min，小心弃去上清后加入 2 ml TriZol 溶液。

2) 向上述裂解液中加入 400 μl 体积氯仿。盖紧离心管盖，剧烈震荡 15 sec，室温静置 3 min。

3) 4°C，12,000 g 离心 15 min。

4) 小心吸取上层水相至新离心管中，加入 1000 μl 体积异丙醇。颠倒混匀后室温放置 10 min。

5) 4°C，12,000 g 离心 10 min。

6) 小心弃去上清，加入 1000 μl 75%乙醇（DEPC 水配制）。涡旋充分洗涤，并轻弹管底，让沉淀悬浮起来。

chinaXiv:202002.00034v1

7) 4°C，7500g 离心 5 min，弃上清，注意不要丢失 RNA 沉淀。

8) 重复步骤 6~7。

9) 在通风橱干燥 10 min。加入 20 µl DEPC 水溶解 RNA，待完全溶解后，取少量检测。

10）取 1 µl 进行琼脂糖凝胶电泳。

S2.3 Hank's 和 R503 保存的样品经不同高温处理后总 RNA、基因组 DNA、RNA 病毒 RNA 以及 DNA 病毒 RNA 的质量影响的实验

S2.3.1 材料

S2.3.1.1 实验模型样本

1）HEK-293T 细胞（自培养）

2）猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻二联活疫苗（WH-1R 株+AJ1102-R 株）（武汉科前生物股份有限公司）（备注：虽然是二联，但是实际引物设计只针对的是 PEDV，因此检测的是 PEDV）。

3）λDNA（Takara #3010）

S2.3.1.2 实验试剂

1）病毒样本保存液（Vazyme # R503）

2）Hank's 溶液（自配）

3）病毒 DNA/RNA 提取试剂盒（Vazyme #RC311-C1）

4）HiScript II U+ One Step qRT-PCR Probe Kit（Vazyme #Q222-CN）

5）Equalbit 1 × dsDNA HS Assay Kit（Vazyme #EQ121）

6）Equalbit RNA HS Assay Kit（Vazyme #EQ211）

7）DL 15000 DNA Marker（Vazyme #MD103）

8）10×DNA Loading buffer（Vazyme #P022）

9）检测 PEDV 引物和探针

引物序列 (5'-3')	PEDV-F1：CGTGAGCCTGGCTTAGTCTTG
	PEDV-R1：CATACGTCGCGATGAAACAAA
探针(5'-3')	PEDV-P1： FAM -CGCATGAACTTCAAAATCATACTGCGACG-BHQ-1
引物稀释方法	无核糖核酸酶污染水稀释至 10 µM

chinaXiv:202002.00034v1

10）检测 λDNA 引物和探针

引物序列 (5’-3’)	lambda DNA-QF4：TTTGCTGCGGTTGCAGAA
	lambda DNA-QR4：ATGATTCGGTTTTCAGGAACATC
探针(5’-3’)	lambda DNA-QP4：FAM-TTACCGTCACCGCCAGTTAATCCGG-BHQ-1
引物稀释方法	无核糖核酸酶水稀释至 10μM

S2.3.2 实验方法

S2.3.2.1 实验模型制备方法

1）模型制备：

	HEK-293T	PEDV	λDNA
Vazyme 病毒样本保存液 R503（1.5 ml）	1.36×10^{6}	1.5 μL	1 ng
Hank’s 溶液（1.5 ml）	1.36×10^{6}	1.5 μL	1 ng

2）处理方案：按上述表格配置混合管，按 1.5 mL/管分装，分装后分别置于 4°C 冰箱，56°C 水浴锅，92°C水浴锅进行不同时间处理。

S2.3.2.2 提取方法（Vazyme #RC311-C1）

1）Vazyme 病毒样本保存液 R503：

预先分装 200 μL 无水乙醇至 1.5 mL 无核糖核酸酶 离心管（自备），再加入 500 μL 病毒样本保存液样本，涡旋混匀；

Hank’s 溶液：

在 1.5 mL 无核糖核酸酶 离心管（自备）中加入 500 μL 裂解液，多个样品可预先分装，再加入 200 μL Hank’s 溶液样本，涡旋混匀；

2）将吸附柱置于 2 mL 收集管中，转移上述混合液至吸附柱中，12,000×g 离心 1 min；

3）弃滤液，将吸附柱装回 2 mL 收集管中，加入 600 μL 漂洗液 12,000×g 离心 30 sec，弃滤液；

4）重复步骤 3 一次；

5）将吸附柱装回收集管中，12,000×g 空柱离心 2 min；

6）将吸附柱转移至新的 1.5 ml 收集管（试剂盒提供）中，

Vazyme 病毒样本保存液：

加入 100 μL 洗脱液至吸附柱的膜中央，室温放置 1 min，12,000 × g 离心 1 min；

chinaXiv:202002.00034v1

Hank’s 溶液：

加入 40 μL 洗脱液至吸附柱的膜中央，室温放置 1 min，12,000 × g 离心 1 min；

7）弃去吸附柱，所得到的 DNA/RNA 可直接用于后续检测或置于-30 ~ -15°C以下短期保存或置于-70°C°C以下长期保存。

S2.3.2.3 检测方法

1）提取细胞样本 gDNA/RNA 检测

1.1）细胞 gDNA 浓度 Qubit 检测（Vazyme #EQ121）

1.1.1）使用前，将试剂盒中各组分平衡至室温；

1.1.2）取足够数量的 0.5 mL PCR 管用于样本和标准品的检测，并在管盖进行标记；

▲仅可使用 0.5 mL PCR 管，推荐使用 Qubit assay tubes (Cat. No. Q32856) or Axygen PCR-05-C tubes (VWR, part no. 10011-830)。

1.1.3）配制检测标准品。取 190 μl 试剂盒中 Equalbit 1 × dsDNA HS Working Solution 至标准品 PCR 管中，再分别加入 10 μL Equalbit 1 × dsDNA HS Standard #1 和 Standard #2 至相应的标准品 PCR 管中，轻轻涡旋振荡 2 - 3 sec，尽量避免产生气泡。此步骤中请确保移液器加量准确；

1.1.4）配制检测样本。取 199 μL Equalbit 1 × dsDNA HS Working Solution 至样本 PCR 管中，分别加入 1μL 待测 dsDNA 样本，使得每个检测样本 PCR 管中终体积为 200 μL，轻轻涡旋振荡 2 - 3 sec，尽量避免产生气泡。此步骤中请确保移液器加量准确；

1.1.5）将所有检测 PCR 管置于室温环境下避光孵育 2 min；

1.16）按照 Qubit 荧光仪的操作说明，选择 dsDNA 高敏检测程序测定浓度。

1.2）细胞 RNA 浓度 Qubit 检测（Vazyme #EQ211）

1.2.1）使用前，将试剂盒中各组分平衡至室温，将提取产物用无核糖核酸酶 H2O 按照 1:10 的比例稀释；

1.2.2）取足够数量的 0.5 mL PCR 管用于样本和标准品的检测，并在管盖进行标记；

▲仅可使用 0.5 mL PCR 管，推荐使用 Qubit assay tubes (Cat. No. Q32856) or Axygen PCR-05-C tubes (VWR, part no. 10011-830)。

chinaXiv:202002.00034v1

1.2.3）配制检测工作液。取试剂盒中 Equalbit RNA HS Reagent，用 Equalbit RNA HS Buffer 按照 1：200 的比例进行稀释，配制成检测工作液，现配现用；

配制检测标准品。取 190 μL 检测工作液至标准品 PCR 管中，再分别加入 10 μL Standard #1 和 Standard #2 至相应的标准品 PCR 管中，轻轻涡旋振荡 2 - 3 sec，尽量避免产生气泡。此步骤中请确保移液器加量准确；

1.2.4）配制检测样本。取 199 μL 检测工作液至样本 PCR 管中，分别加入 1μL 待测 RNA 样本，使得每个检测样本 PCR 管中终体积为 200 μL，轻轻涡旋振荡 2 - 3 sec，尽量避免产生气泡。此步骤中请确保移液器加量准确；

1.2.5）将所有检测 PCR 管置于室温环境下避光孵育 2 min；

1.2.6）按照 Qubit 荧光仪的操作说明，选择 RNA 高敏检测程序测定浓度。

1.3）细胞 RNA 浓度以及纯度 OneDropt 检测

1.3.1）用洗脱液清洗检测探头，并校正，分别取 1μL 样本按 OneDrop 仪的操作说明进行 RNA 浓度与纯度检测。

1.4）细胞 gDNA 与 RNA 完整性检测（Vazyme #MD103、P022）

1.4.1）配制 1.2%琼脂糖凝胶；

1.4.2）分别取 5 μL 提取产物，加入 1μL 10×DNA Loading buffer 以及 4μL 无核糖核酸酶 H2O，涡旋混匀后，放置 PCR 仪中 72℃，2 min 变性处理；

1.4.3）取 5 μL DL15000 Marker 一起点样；

1.4.4）于电泳仪中进行琼脂糖凝胶电泳，冰上 220V，7 - 10min；

1.4.5）凝胶成像仪拍照。

2）提取微量样本 DNA/RNA 检测（Vazyme #Q222-CN）

2.1）在无核糖核酸酶污染离心管中配制如下混合液（以 ABI StepOnePlusTM 为测试机型）

无核糖核酸酶 ddH2O	To 25 μL
2 × One Step U+ Mix	12.5 μL
One Step U+ Enzyme Mix	1.25 μL
50 × ROX Reference Dye 1	0.5 μL
Gene Specific Primer Forward（10 μM）	0.5 μL
Gene Specific Primer Reverse（10 μM）	0.5 μL

chinaXiv:202002.00034v1

TaqMan Probe（10 μM）	0.25 μL
模板	5 μL

2.2) 按下列条件进行 One Step qRT-PCR 反应

Stage1	逆转录	Reps：1	55□	15min
Stage2	预变性	Reps：1	95□	30sec
Stage3	循环反应	Reps：45	95□	10sec
			60□	30sec

S2.4 统计学检验

采用成组 T-检验。$p<0.05$ 示差异显著，$p<0.01$ 示差异极显著。

chinaXiv:202002.00034v1